

BEST AVAILABLE COPY

PRODUCTION OF INTERFERON

Publication number: JP57002220

Publication date: 1982-01-07

Inventor: IIZUKA MASAHICO; SANO EMIKO

Applicant: TORAY INDUSTRIES

Classification:

- International: A61K38/21; A61K39/00; C12P21/00; A61K38/21;
A61K39/00; C12P21/00; (IPC1-7): A61K39/00

- European:

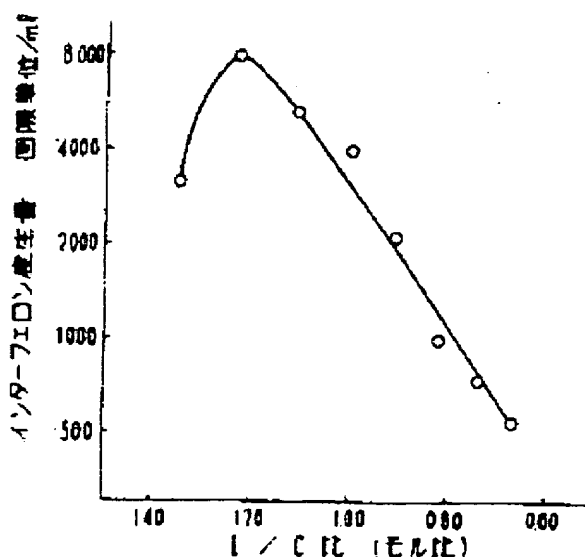
Application number: JP19800076690 19800609

Priority number(s): JP19800076690 19800609

Report a data error here

Abstract of JP57002220

PURPOSE: To obtain interferon in high yield, by stimulating an animal cell grown on a microcarrier having positively charged chemical residues with an inducer consisting of polyriboinosinic acid (poly I) and polyribocytidylic acid (poly C) in a specific proportion. CONSTITUTION: An animal cell, e.g. human diploid cell, grown on a microcarrier, e.g. a crosslinked dextran microcarrier having diethylaminoethyl groups, having positively charged chemical residues is stimulated with an interferon inducer consisting of a polyriboinosinic acid (poly I) and polyribocytidylic acid (poly C) as constituents to produce interferon. In the process, the inducer is used in a range in which the molar fraction of the hypoxanthine base in the poly I over that of the cytosine base in the poly C, particularly I/C=1.1-1.3. The production of the interferon reaches 2.7 times that in the case of the conventional I/C=1.



Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

⑬ 日本国特許庁 (JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報 (A)

昭57-2220

⑤ Int. Cl.³
A 61 K 39/00

識別記号

庁内整理番号
6408-4C

⑬ 公開 昭和57年(1982)1月7日

発明の数 1
審査請求 未請求

(全 4 頁)

⑭ インターフェロン産生方法

⑯ 特 願 昭55-76690

⑰ 出 願 昭55(1980)6月9日

⑱ 発 明 者 飯塚雅彦
鎌倉市手広1111番地東レ株式会
社基礎研究所内

⑲ 発 明 者 佐野恵海子
鎌倉市手広1111番地東レ株式会
社基礎研究所内

⑳ 出 願 人 東レ株式会社
東京都中央区日本橋室町2丁目
2番地

㉑ 代 理 人 弁理士 齊藤武彦 外2名

明 細 書

1. [発明の名称]

インターフェロン産生方法

2. [特許請求の範囲]

正に荷電した化学的残基を有するマイクロキャリヤ上に増殖した動物細胞をポリリボイノシン酸およびポリリボシチル酸を構成成分として含むインターフェロン誘発剤を用いて刺激しインターフェロン産生を行なわせるに際し、ポリリボイノシン酸中のヒポキサン塩基のモル分率がポリリボシチル酸中のシトシン塩基のモル分率を上まわる範囲で使用することを特徴とするインターフェロン産生方法。

3. [発明の詳細な説明]

本発明はインターフェロン産生方法にかゝるものであり、更に詳しくは正に荷電した化学的残基を有するマイクロキャリヤ上に増殖した動物細胞をポリリボイノシン酸(ポリI)お

よびポリリボシチル酸(ポリC)を構成成分として含むイ

ンターフェロン誘発剤で刺激してインターフェロン産生を行
わせる方法に関するものである。

インターフェロンは各種のウイルスや二重鎖RNA等の誘
起剤の刺激により動物細胞が産生するタンパク質であり、ウ
イルスの細胞内増殖を抑制する作用を有する。インターフェ
ロンの作用はウイルス種に関しては非特異的であるが、動物
種に関しては特異的である。すなわち、ある動物種の細胞で
産生されたインターフェロンは他の動物種に対しては作用し
ない。近年ある種のウイルス性疾患さらには腫瘍に対するイ
ンターフェロンの治療効果が認められるに至り、その医療薬
としての可能性が注目を集めている。インターフェロンを医
薬として応用するためには、ヒトの何らかの細胞を用いて生
体外でインターフェロンを産生させこれを分離精製すること
が必要となる。ヒト・インターフェロンを産生させる為の細

胞としてこれまでは血液より分離した白血球が用いられることが多かつたが、次第に胎児あるいは新生児由来の二倍体細胞がこれに代わろうとしている。白血球の供給は不特定多数の人間にたよるを得ず、また白血球の産生したインターフェロン標品中には各種のリンフォカインが混入している恐れが多い。従つて白血球から得られるインターフェロン標品の安全性に対する監視は必ずしも容易ではない。これに対して二倍体細胞にあつては一個体由来のものを大量に培養することが可能であるので、得られるインターフェロン標品の安全性の確認は白血球由来の場合に比して容易であると考えられている。

従来、二倍体細胞等の保留依存性細胞の培養法としては、ルー瓶もしくはローラ瓶を用いる培養方法が知られているがこれらの方法により大量の保留依存性細胞を培養することはかなり困難であると考えられている。これらの方法において

て、スーパーインダクション法と呼ばれる、二重鎖RNA等のインターフェロン誘発剤を用いて細胞を刺激した後、シクロヘキシミド、アクチノマイシンDなどの代謝阻害剤で細胞を処理することによりインターフェロン産生を一層増強せしめる方法（米国特許第3,773,924号）、UV法と呼ばれるインターフェロン誘発剤を用いて細胞を刺激する前後数時間の間に細胞に紫外線を照射して、インターフェロン産生を一層増強せしめる方法、等の方法が知られている。かかるインターフェロン産生方法はインターフェロン誘発剤として例えばポリI：ポリC等の二重鎖合成核酸を用いる場合に特にその効果が顕著である。

本発明者等は、二倍体細胞等の培養細胞由来のインターフェロンを大量に産生させる方法として、上記培養方法およびインターフェロン産生方法に着目し、マイクロキヤリヤ培養法で培養した細胞に、二重鎖合成核酸等をインターフェロン誘

特開昭57-2220(2)

は、細胞はルー瓶の底面もしくはローラ瓶の側面に単層に増殖するだけであるため大量培養にあつては、極めて多数のルー瓶もしくはローラ瓶を扱う必要があり、取り扱いが煩雑となることを避け難い。

これに対し、最近、保留依存性細胞の大量培養に適したマイクロキヤリヤ培養法と称される培養法が開発された（特開昭53-62889、米国特許第4,189,534号）。

この培養法は、正に荷電した化学的残基を有するマイクロキヤリヤ（以下、単にマイクロキヤリヤと呼称する）を懸濁させた培地中に種細胞を接種し、懸濁状態で培養する方法であり、接種された細胞はマイクロキヤリヤ表面に付着し、そこで増殖する。マイクロキヤリヤ培養法は、細胞付着表面積を大きくすることが容易であり、かつ、その取り扱いも容易であるため特に、保留依存性細胞の大量培養に適した培養法である。

一方、培養細胞にインターフェロンを産生させる技術とし

発剤とするスーパーインダクション法により、インターフェロンを産生させることを試みてきた、かかる方法の基本条件等については前記米国特許第4,189,534号にすでに記載がある。

ポリIおよびポリCからなる複合物を用いてインターフェロン産生を誘発させる場合、一般的にはポリI中のヒポキサン塩基とポリC中のシトシン塩基のモル比（I/C比）が1であり過不足なく塩基対を形成している2重鎖RNAの形で用いることが多い。事実FulcoffらはI/C比とインターフェロン産生能を調べた結果、I/C比が1の点でインターフェロン産生が最高値を示すことを報告している。（*Biochem. Biophys. Acta.* 174, 108 - 116. 69）

本発明者等はマイクロキヤリヤ培養法で培養したヒト2倍体細胞等でインターフェロンを大量に産生させる際に、ポリIおよびポリCを構成成分として含む核酸物質をインターフェ

ロン誘発剤として用いる場合、 I/C 比がインターフェロン産生能に著しく影響をおよぼすことを見出し、本発明に到達した。即ち、ガラス面上やポリスチレン面上等に増殖した細胞では I/C 比=1でインターフェロン産生が最高値を示すのに対し、正に荷電した化学的残基を有するマイクロキャリヤ上で増殖した細胞では I/C 比>1でインターフェロン産生が最高値を示すことを見出した。更に具体的に説明するとマイクロキャリヤ上に増殖した細胞を用いてインターフェロン産生を行なわせる場合、 $I/C=1$ の2重鎖ポリI:ポリCをインターフェロン誘発剤として用いるより、 $I/C>1$ 、より好ましくは $I/C=1.05\sim 1.33$ 、特に好ましくは $I/C=1.1\sim 1.3$ の範囲で用いることにより明らかに高力価のインターフェロン産生を行なわせることが可能であることを見出した。

以下に実施例でマイクロキャリヤ上で増殖した細胞を用いて

べく均等に分配されるように200mlづつ8本の小型スピナーフラスコに分注した、細胞およびマイクロキャリヤを沈降させ、上清培地を捨てた後、シクロヘキシミド、 $10\mu g/ml$ およびそれぞれ定められた I/C 比でポリI+ポリCを両スクレオチド中のりん酸含量として $115\mu mol/ml$ を加え、 $37^\circ C$ で4時間培養し、更にアクチノマイシンDを $4\mu g/ml$ になるように加え、1時間細胞を処理した後、細胞およびマイクロキャリヤを沈降させ、上清液を捨て、イーグルMEM培地を捨てた量と同量加え、更にこの操作をもう一度繰り返した、最終的にメチルセルロース0.05%を添加したイーグルMEM培地を捨てた量(約180ml)と同量加え、 $37^\circ C$ で24時間培養を継続した、最終的に用いた培地中に産生されたインターフェロンの量をFL細胞およびVesicular stomatitis virusを用いたCPE-Inhibition法で測定し、国際単位に換算した、結果を図1に示す。

行なつた本発明方法の一例を説明する。併わせてプラスチック平面上で増殖した細胞を用いて行なつた実験を参考例として示す。

実施例

仔牛血清5%、ジエチルアミノエチル基を有する架橋デキストランマイクロキャリヤ 0.25% を含むイーグルMEM培地 $1.6\angle$ にヒト2倍体細胞を 1.0×10^5 ヶ/mlの割合いで接種し、ガラス製スピナーフラスコでゆるく攪拌しながら $37^\circ C$ で7日間培養した。途中1回培養培地を仔牛血清5%を含む新しいイーグルMEM培地と交換した。到達細胞数は 8.0×10^5 ヶ/mlであつた。次に細胞およびマイクロキャリヤを沈降させ上清培地を捨て、インターフェロン100国際単位/mlおよび仔牛血清2%を含むイーグルMEM培地を捨てた培地量に等しい量加え、 $37^\circ C$ で20時間培養を継続した。次に細胞およびマイクロキャリヤを含む培養液をマイクロキャリヤ量になる

図1から明らかなように $I/C=1.05\sim 1.33$ の範囲ではインターフェロン産生は $I/C=1$ の場合のインターフェロン産生量を上まわり、 $I/C=1.2$ 付近では $I/C=1$ の場合のインターフェロン産生量の2.7倍にも達した。

参考例

培養面積25mlのポリスチレン製組織培養フラスコに実施例で用いたと同じヒト2倍体細胞 4×10^5 ヶ/フラスコを仔牛血清5%を加えたイーグルMEM培地8mlに加え、 $37^\circ C$ で6日間培養した。到達細胞数は 2.5×10^6 ヶ/フラスコであつた。古い培養液を捨て、インターフェロン100国際単位/mlおよび仔牛血清2%を含むイーグルMEM培地8ml/フラスコを加え、 $37^\circ C$ でおよそ20時間培養を継続した再び培養液を捨てる。シクロヘキシミド $5\mu g/ml$ およびそれぞれ定められた割合いでポリI+ポリCを両スクレオチド中のりん酸含量として $23\mu mol/ml$ を加え、 $37^\circ C$ で4時間培養し、

更にアクトノマイシンDを $4\mu\text{g}/\text{ml}$ になるように加え1時間細胞を処理する。上清液を捨て、メチルセルロース 0.05% を添加したイーグルMEM培地を $8\text{ml}/\text{フラスコ}$ 加え 37°C で48時間培養を継続した、最終的に用いた培地中に產生されたインターフェロンの量をFL細胞およびVesicular stomatitis virusを用いたCPE-Inhibition法で測定し国際単位に換算した。結果を図2に示す。

図2から明らかなように平面培養細胞では I/C 比=1でインターフェロン產生は最高値を示すが I/C 比の変化に対するインターフェロン產生量の変化の割合はマイクロキャリヤ培養細胞の場合に比べて低い。

4. [図面の簡単な説明]

図1はマイクロキャリヤ培養細胞を I/C 比の異なるポリIおよびポリC混合物でインターフェロン產生させた場合の I/C 比(横軸)とインターフェロン產生量(縦軸)の関係を、

示した線図であり、図2は平面培養細胞を I/C 比の異なるポリIおよびポリC混合物でインターフェロン產生させた場合の I/C 比(横軸)とインターフェロン產生量(縦軸)の関係を示した線図である。

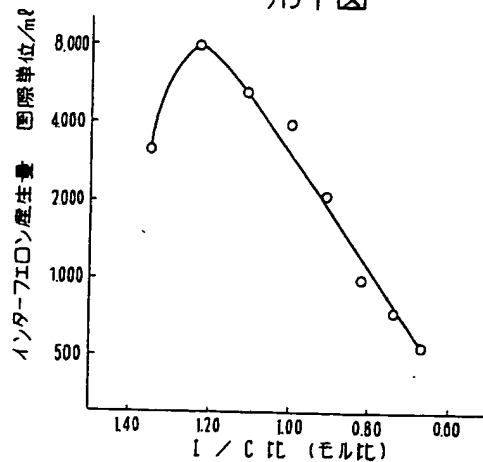
特許出願人 東レ株式会社

代理人 弁理士 斉藤武彦

同 弁理士 川瀬良治

同 弁理士 吉野孝親

第1図



第2図

